

Структурно-функциональная организация контрольного района митохондриальной ДНК шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*)

И.В. Корниенко^{1,2*}, Фалеева Т.Г.^{2,3}, Н.В. Орешкова^{4,5}, С.Е. Григорьев⁶, Л.В.
Григорьева⁷, Ю.А. Путинцева⁵, К.В. Крутовский^{5,8,9,10}

¹Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук,
г. Ростов-на-Дону, Россия, 344006

²Южный федеральный университет, Научная лаборатория «Идентификация объектов
биологического происхождения», г. Ростов-на-Дону, Россия, 344090

³Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Кафедра судебной медицины, г. Санкт-Петербург, Россия, 195067

⁴Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук,
Лаборатория лесной генетики и селекции, Красноярск, Россия, 660036

⁵Сибирский федеральный университет, Научно-образовательный центр геномных
исследований, Лаборатория лесной геномики, г. Красноярск, Россия, 660036

⁶Северо-Восточный федеральный университет, Лаборатория Музей мамонта им. П.А.
Лазарева, Институт прикладной экологии Севера, г. Якутск, Россия, 677980

⁷Северо-Восточный федеральный университет, Международный центр коллективного
пользования “Молекулярная палеонтология”, Якутск, 677980 Россия

⁸Гёттингенский университет им. Георга-Августа, Отделение лесной генетики и селекции,
Гёттинген, Германия, 37077

⁹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Лаборатория
популяционной генетики, Москва, Россия, 119991

¹⁰Техасский АМ университет, Колледж Стейшин, Отделение изучения и управления
экосистем, Техас 77843-2138, США

*e-mail: ikornienko@yandex.ru

Резюме. Из останков шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*) с хорошо сохранившимися мягкими тканями, обнаруженных на острове Малый Ляховский Новосибирского архипелага в середине августа 2012 года удалось получить качественные препараты высокомолекулярной ДНК, несмотря на возраст находки (около 33 тысяч лет). Благодаря этому впервые расшифрованы все функционально значимые участки контрольного района митохондриальной ДНК шерстистого мамонта.

Ключевые слова: древняя ДНК, митохондриальная ДНК, контрольный регион, шерстистый мамонт, палеогенетика

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что к настоящему времени полностью прочитаны и расшифрованы митохондриальные (мт) геномы нескольких шерстистых мамонтов [1-6], структурно-функциональная организация контрольного района мтДНК мамонтов до представленного здесь исследования оставалась неизвестной. В ряде работ упоминается наличие tandemных повторов в некодирующих участках контрольного района мтДНК [3]. Однако сведения в научной литературе о функциональной роли этих повторов или о присутствии иных функционально значимых элементов в контрольном регионе мтДНК шерстистых мамонтов отсутствуют. В настоящей работе на примере малоляховского мамонта проведена полная расшифровка всех ключевых элементов некодирующего района мтДНК шерстистого мамонта.

В конце лета 2012 г. на острове Малый Ляховский (74°07' с.ш., 140°40' в.д.) Новосибирского архипелага недалеко от морского побережья на склоне невысокого холма была обнаружена туша шерстистого мамонта, *Mammuthus primigenius*. По оценке палеонтологов, возраст находки составляет 32,5-33 тысяч лет [7]. Главной особенностью малоляховского мамонта явилась уникальная сохранность мягких тканей. В результате обследования туши мамонта выяснилось, что хорошо сохранились нижняя часть головы, частично оволосенный хобот (единственный в мире сохранившийся хобот взрослого мамонта) (рис. 2), области шеи и брюха, полностью передние конечности, и дистальная половина правой задней конечности. Верхняя часть трупа – череп, позвонки, дорзальные части ребер, тазовые кости, левая задняя нога были объедены хищниками и скелетированы вследствие того, что после гибели животного эти части оставались на поверхности земли (предположительно мамонт нижней частью провалился в промоину). При раскопках не удалось обнаружить большинство позвонков и около половины ребер. Вероятно, эти мелкие кости были растащены животными. Отсутствует также левая ветвь тазовой кости. Череп фрагментирован на несколько частей. В полной анатомической последовательности сохранился скелет левой задней конечности с остатками шерсти и жировой ткани в области колена и стопы. Нога была вытянута назад в горизонтальной плоскости. Правая задняя конечность от голени и ниже оказалась подвернута под брюхо в неестественной для нормального физиологического состояния позе. Мышечные ткани передних конечностей имели буроватый цвет. Кожа сохранила эластичность, и в целом мумификация туши была минимальной благодаря залеганию нижней части туловища в практически чистом льду.

В процессе раскопок в ледовых пустотах ниже брюха и в подмышечной области в двух местах наблюдалось скопление небольшого количества темно-бурой жидкости, что удивительно, учитывая возраст находки. Большое количество этой замерзшей бурой

жидкости окружало всю тушу в самой ее нижней части. Морфологические признаки свидетельствовали, что животное было старой самкой приблизительно 50-60 лет, в частности, судя по относительно небольшому размеру – рост около 230 см в холке, наличию сосков, форме и весу бивней (16 и 17 кг), и состоянию последней генерации зубов [7].

Целью настоящей работы явилось отработка оптимальной методики выделения ДНК из биологических объектов шерстистого мамонта, а также секвенирование контрольного района мтДНК с расшифровкой его функционально значимых элементов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пробоподготовка биологического материала

Для молекулярно-генетического исследования были отобраны фрагменты мышечных тканей хоботы, а также фрагменты плечевой кости и ребра.

Костные фрагменты помещали в отдельные емкости и промывали под проточной водой в течение 10 мин, затем очищали от налета, губчатого вещества (плечевая кость) и поверхностного слоя компактного вещества. Затем костные фрагменты очищали моющим раствором «Аламинол», разбавленным проточной водой 1:10 с последующей обработкой 7 мМ раствором NaOCl. Далее их промывали проточной и стерильной деионизованной водой и помещали в стерильные чашки Петри. В открытых чашках Петри костные фрагменты сушили в УФ-боксе BLX-254 (Vilber Lourmat) при ультрафиолетовом излучении длиной волны 254 нм и мощностью 40 W, в течение 15 мин с каждой из сторон кости. Затем костные фрагменты в открытых чашках Петри сушили 1 сутки при комнатной температуре.

При помощи портативной стоматологической бормашины УС-01 «Селена-2000» очищали наружную поверхность компактного слоя ребра, затем электрической осциллирующей аутопсийной пилой (Mortech Manufacturing) производили выпилы небольших фрагментов ребра (не более 10×10 мм).

Полученные костные фрагменты измельчали в шаровой мельнице Retsch MM200 в предварительно охлажденных до -70 °С стаканах из нержавеющей стали объемом 25 мл. Полученные костные порошки переносили в отдельные стерильные 15 мл пробирки Costar и хранили при -70 °С.

Из глубоких слоев мягких тканей хобота при помощи стерильных скальпеля и ножниц вырезали фрагменты размером около 5 мм × 5 мм, которые измельчали на более мелкие фрагменты непосредственно в стерильных 1,5 мл пробирках Эппендорф.

Выделение ДНК из костной ткани плечевой кости и ребра, и мягких тканей хобота проводили тремя способами с использованием приблизительно по 150 мг биологического материала и коммерческих наборов «PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit» (Applied Biosystems, USA) согласно протоколу [8] и «DNA IQ System» (Promega, USA) согласно протоколу [9, 10], а также при помощи процедуры фенол-органической экстракции согласно протоколу [11] с модификациями.

При работе с мягкими тканями хобота около 150 мг измельченных мягких тканей помещали в стандартные 1,5 мл микроцентрифужные пробирки. Добавляли по 550 мкл лизирующего буфера (10 mM трис-HCl, pH 7,5; 10 mM Na₂ЭДТА; 50 mM NaCl; 2% додецилсульфата натрия (ДСН)), по 15 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и по 10 мкл 1 М дитиотрейтола (ДТТ).

Для декальцинирования пробирки с 0,5 г костного порошка из плечевой кости и ребра заполняли по 10 мл 0,5М ЭДТА и тщательно перемешивали в течение 1 мин. Центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин. Супернатант сливали, затем добавляли по 4,5 мл лизирующего буфера (10 mM трис-HCl, pH 7,5; 10 mM Na₂ЭДТА; 50 mM NaCl; 2% ДСН), по 200 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и по 200 мкл ДТТ 1 М.

Для контроля чистоты реагентов в процессе выделения ДНК проводили экстракцию пробы, содержащей реактивы, используемые в процессе выделения (холостая проба).

Пробирки с образцами кожи, мягких тканей хобота и костным порошком тщательно перемешивали и инкубировали 1 час при +56 °С, затем при +37 °С в течение 24 часов. Затем образцы центрифугировали при 12000 g в течение 5 мин. Супернатант из каждой пробирки переливали в две отдельные стерильные пробирки. Добавляли равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамилол (25:24:1) и встряхивали на вортексе. Центрифугировали содержимое пробирок в течение 5 мин при 12000 g. Верхнюю водную фазу переносили в стерильные пробирки. Экстрагирование смесью фенол/хлороформ/изоамилол (25:24:1) проводили еще дважды. К водному раствору с ДНК добавляли равный объем н-бутанола, встряхивали на вортексе несколько сек, центрифугировали содержимое пробирок 5 мин при 12000 g. Верхний слой н-бутанола удаляли, оставив в пробирке водный раствор с ДНК. Для очистки и концентрирования препарата ДНК использовали устройство «AmiconUltra-4, ultracel 30k». Конечный объем препаратов ДНК составил 50 мкл.

***ПЦР амплификация, количественная оценка, секвенирование и видовая идентификация
выделенных препаратов ДНК***

Оценку количества мтДНК, выделенной из фрагментов плечевой кости и ребра, а также мягких тканей хобота малоляховского шерстистого мамонта, проводили с помощью термоциклера с мультиканальным детектором iQ5 (Bio-Rad).

Регистрацию накопления ампликонов в реальном времени и построение калибровочных кривых проводили по технологии выполнения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени», основанной на усилении флуоресценции при связывании интеркалятора EVA Green с двухцепочечной ДНК.

ПЦР амплификацию фрагмента гена *cytB* проводили с использованием универсальных праймеров [12] (табл. 1):

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР амплификации фрагмента митохондриального гена *cytB* исследуемых образцов малоляховского мамонта

Прямые (F) и обратные (R) ПЦР праймеры	Нуклеотидные последовательности (5'-3')
F14816	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA
R15173	CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA

ПЦР амплификацию при конечной концентрации ионов магния 2,5 mM проводили при помощи термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) в режиме эмуляции 1 °C/сек в с использованием следующей программы: предварительная инкубация при 95 °C в течение 2,5 мин, затем 35 циклов, каждый из которых включал денатурацию при 95 °C в течение 15 сек, отжиг праймеров при 50 °C в течение 1 мин, и элонгацию при 72 °C в течение 2 мин, с последующим завершающим этапом элонгации при 72 °C в течение 10 мин.

ПЦР амплификацию контрольного района мтДНК малоляховского мамонта проводили с использованием прямых праймеров Mom_1F, Mom_2F и Mom_3F в различных сочетаниях с обратными праймерами Mom_1R, Mom_2R, Mom_3R и Mom_4R. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 2.

Таблица 2. Праймеры, использованные для ПЦР амплификации контрольного района мтДНК малоляховского мамонта

Прямые (F) и обратные (R) ПЦР праймеры	Нуклеотидные последовательности (5'-3')
Mom_1F(15377)	CGCTATCAATACCCAAAAGTGA
Mom_2F (15513)	GACCATACTATGTATAATC
Mom_3F (15863)	TCTTACTTCAGGACCATCT

Mom_1R (15916)	CTTATTTAAGAGGAAAGAG
Mom_2R (16569)	GAAGAGATAGTTACATAGTG
Mom_3R(16789)	CAAATCTAGGAACATGGCTCTT
Mom_4R (60)	AGTTGGATATACTCGTCTAGG

ПЦР амплификацию при конечной концентрации ионов магния 2,5 мМ проводили при помощи термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) в режиме эмуляции 1 °С/сек с использованием следующей программы: предварительная инкубация при 95 °С в течение 2,5 мин, затем 35 циклов, каждый из которых включал денатурацию при 95 °С в течение 20 сек, отжига праймеров при 55 °С в течение 20 сек, и элонгацию при 72 °С в течение 2 мин, с последующим завершающим этапом элонгации при 72 °С в течение 10 мин.

Продукты ПЦР подвергались очистке с помощью колонок GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific, USA).

Секвенирование амплифицированных участков мтДНК проводили с помощью тест-набора для секвенирования DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) v. 1.1 (а также v. 3.1). Электрофорез образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl. Анализ нуклеотидных последовательностей мтДНК выполняли с помощью программы «Sequencing Analysis» (версия 5.3).

ПЦР-амплификацию локуса, содержащего участок STR с повторяющимся мотивом ACGCAT контрольного района мтДНК малоляховского мамонта, проводили с использованием флуоресцентно меченного красителем FAM прямого праймера Mom_16146F в различных сочетаниях с обратными праймерами Mom_16570R, Mom_16611R, Mom_60R, нуклеотидные последовательности которых приведены в табл. 3.

Таблица 3. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для ПЦР амплификации STR-локуса контрольного района мтДНК малоляховского мамонта

Прямые (F) и обратные (R) ПЦР праймеры	Нуклеотидные последовательности (5'-3')
Mom_16146F-FAM	TAAATTCCCAGCGTACACGC
Mom_16570R	GAAGAGATAGTTACATAGTGG
Mom_16611R	AGTTACCCTTGGCTCAATTTC
Mom_60R	AGTTGGATATACTCGTCTAGG

ПЦР амплификацию при конечной концентрации ионов магния 2,0 мМ проводили при помощи термоциклера GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) в режиме эмуляции 1 °С/сек с использованием следующей программы: предварительная инкубация при 95 °С в течение 2,5 мин, затем 32 цикла, каждый из которых включал этап денатурации при 95 °С в течение 20 сек, отжиг праймеров при 58 °С в течение 20 сек, и элонгацию при 72 °С в течение 1 мин, с последующим завершающим этапом элонгации при 72 °С в течение 10 мин.

Электрофорез образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl. Длину ампликонов определяли с помощью программы GeneMapper ID (версия 3.2) по размерным стандартам ROX500 и ROX1000 с использованием алгоритма расчета «Size Calling Method – Local Southern Method».

Анализ ДНК-последовательностей

С целью определения консервативных нуклеотидных последовательностей в контрольном регионе мтДНК малоляховского мамонта с помощью программ Clustal X v. 2.1 [13] и UGENE v. 1.27 [14] проведены множественные сравнения с аналогичными нуклеотидными последовательностями у различных видов млекопитающих [15].

Анализ вторичной структуры фрагментов одноцепочечной ДНК проводили с помощью программы «RNAstructure» [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Прежде всего, для доказательства принадлежности выделенной ДНК шерстистому мамонту был секвенирован фрагмента митохондриального гена цитохрома b с использованием универсальных праймеров [12] и полученный сиквенс сравнен с нуклеотидной базой NCBI Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) с помощью BLASTn. Было обнаружено полное совпадение амплифицированного фрагмента с сиквенсами гена цитохрома b шерстистого мамонта, *Mammuthus primigenius* (напр., D50842.1, FJ655900.1 и др.), что однозначно доказало принадлежность выделенной ДНК именно этому виду.

Необходимо отметить, что в древней ДНК накапливаются различные повреждения, наиболее частым из которых является самопроизвольный гидролиз аминогруппы в положении 4' цитозина (Ц), и превращение последнего в урацил (У), что приводит в процессе ПЦР к замене урацила на тимин (Ц→У→Т).

Несмотря на большой возраст находки (около 33 тысяч лет [6]), никаких изменений, присущих древней ДНК (признаки дезаминирования остатков цитозина и аденина), в ДНК-матрице, полученной из различных биологических объектов малоляховского мамонта

(хобота, плечевой кости и ребра), обнаружено не было, что дополнительно свидетельствует о высокой сохранности тканей и ДНК.

В ходе последующих исследований был генотипирован контрольный регион митохондриального генома малоляховского шерстистого мамонта (*Mammuthus primigenius*). При его множественном выравнивании с контрольными районами мтДНК *Homo sapiens* (V00662), *Mus musculus* (V00711), *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Cephalorhynchus commersonii*, *Kogia breviceps*, *Balaena mysticetus* (X14848), *Bos taurus* (V00654), *Ovis aries* (L29055), *Diceros bicornis* (L22010), *Equus asinus* (X97337), *Equus caballus* (X79547), *Halichoerus grypus* (X72004) и *Didelphis virginiana* (Z29573) [15] были идентифицированы консервативные последовательности CSB1, CSB2, CSB3 (conserved sequence block) и ETAS (extended termination associated sequences 1) (табл. 4), ассоциированные с сайтами начала и завершения транскрипции мтДНК, соответственно [17].

Таблица 4. Нуклеотидные последовательности функционально-значимых участков контрольного района малоляховского шерстистого мамонта

Локус	Последовательность, 5'→3'	Длина, н.п.
CSB1	ATTCAAGTCAATGCTCAGAGGACATA	25
CSB2	CAAAACCCCTTACCCCTT	19
CSB3	TGTCAAACCCCAAAAGCA	18
ETAS	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTAC TGTTTAA	64
Центральный регион	CTTAACCTACCTACCTCCGAGAAACCATCAACCCGCCCATCTTCGTGTCCCTCTTC TCGCTCCGGGCCCATCAATTGTGGGGGTTTCTATACTGGATCTATACCTGGCATC TGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAAAATCGCCCACTCTTTCCTCTTAAAT AAGACATCTCGATGGATTAATGACTAATCAGCCCATGATCATAACATAACTGTG GTGTCATGCATTTGGTATCTTTTAAATTTGGGGATGCTGTGATTCAGCTATGGC CGTCTGAGGCCCTAACACAGTCAAGCAACTGTAGCTGAGCTTG	318

Сравнительный анализ локуса ETAS среди различных представителей класса млекопитающих, включая отряд хоботных, показал его консервативность в процессе эволюции хоботных (табл. 5), что указывает на важное функциональное значение этого локуса мтДНК. ETAS малоляховского мамонта содержит 3 участка, способных к формированию шпильчатых структур, которые, возможно, и принимают участие в терминеции транскрипции мтДНК (рис. 1).

Таблица 4. Структура ETAS контрольного района мтДНК у ряда представителей млекопитающих, в том числе хоботных

Вид (NCBI GenBank Accession No.)	Нуклеотидная последовательность ETAS, 5'→3'
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGCACT—GTTTAA
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)	CCATACCATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Mammut americanum</i> (EF632344)	CCATACTATGTATAATCGTACATACACTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAG
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGCACT—GTTTAA
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGCACT—GTTTAA
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)	CCATACCATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAG
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)	CCATACTATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)	CCATACCATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)	CCATACCATGTATAATCGTGCATCACATTATTTACCCCATGCTTATAAGCAAGTACT—GTTTAA
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)	CCATCCTATGTATAATCGTGCATTACACTACTTACCCCATGCATATAAGCCAGTACG—GTAGGA
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)	CCATCCTATGTATAATCGTACATTACACTATATACCCCATGCTTATAAGCAGGTACA—GTACAA
<i>Procavia capensis</i> (AJ428945)	CAACCCCTATGTATA—TCGTGCATAAC—TGACTTACCCCATGCATATAAGCAAGTACATAAGATCAA
<i>Procavia capensis</i> (NC_004919)	CAGCCCTATGTATA—TCGTGCATAAC—TGACTTACCCCATGCATATAAGCAAGTACATAAAGTCAA
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301)	CGGCCCTATGTATA—TCGTGCATAA—ATGATCTACCCCATGCATATAAGCCAGTACATAACGTCAA

Примечание. Серым цветом выделены отличия от нуклеотидной последовательности ETAS контрольного района мтДНК малоляховского мамонта.

Один из представителей азиатских слонов, *Elephas maximus* (AJ428946), имел идентичный малоляховскому мамонту сиквенс CR. У двух других (EF588275 и NC_005129) различия были представлены транзициями С→Т в положениях 150 и 286. Кроме того, у одного из трех *E. maximus* (EF588275) в позициях 218 и 219 присутствовали делеции нуклеотидов Т и G, соответственно.

Нуклеотидные замены в CR африканских саванных слонов, *Loxodonta africana* (NC_000934, AB443879, DQ316069) были представлены транзициями С→Т в позициях 102 и 150, а также трансверсиями А→Т в позиции 119.

Отличия нуклеотидной последовательности CR африканских лесных слонов, *Loxodonta cyclotis* от малоляховского мамонта представлены транзициями С→Т и Т→С в позициях 150 и 240, соответственно, а также трансверсиями А→Т в позициях 119 и 244. Отсутствие 35 нуклеотидов на 3'-конце CR у одного из африканских лесных слонов (KJ557423) [18] можно объяснить очевидно только неполным сиквенсом мтДНК этого животного.

Функциональное значение CR до конца не выяснено. Однако способность этого локуса формировать стабильные шпилечные структуры (рис. 3) косвенно указывает на его важную роль в транскрипции мтДНК хоботных.

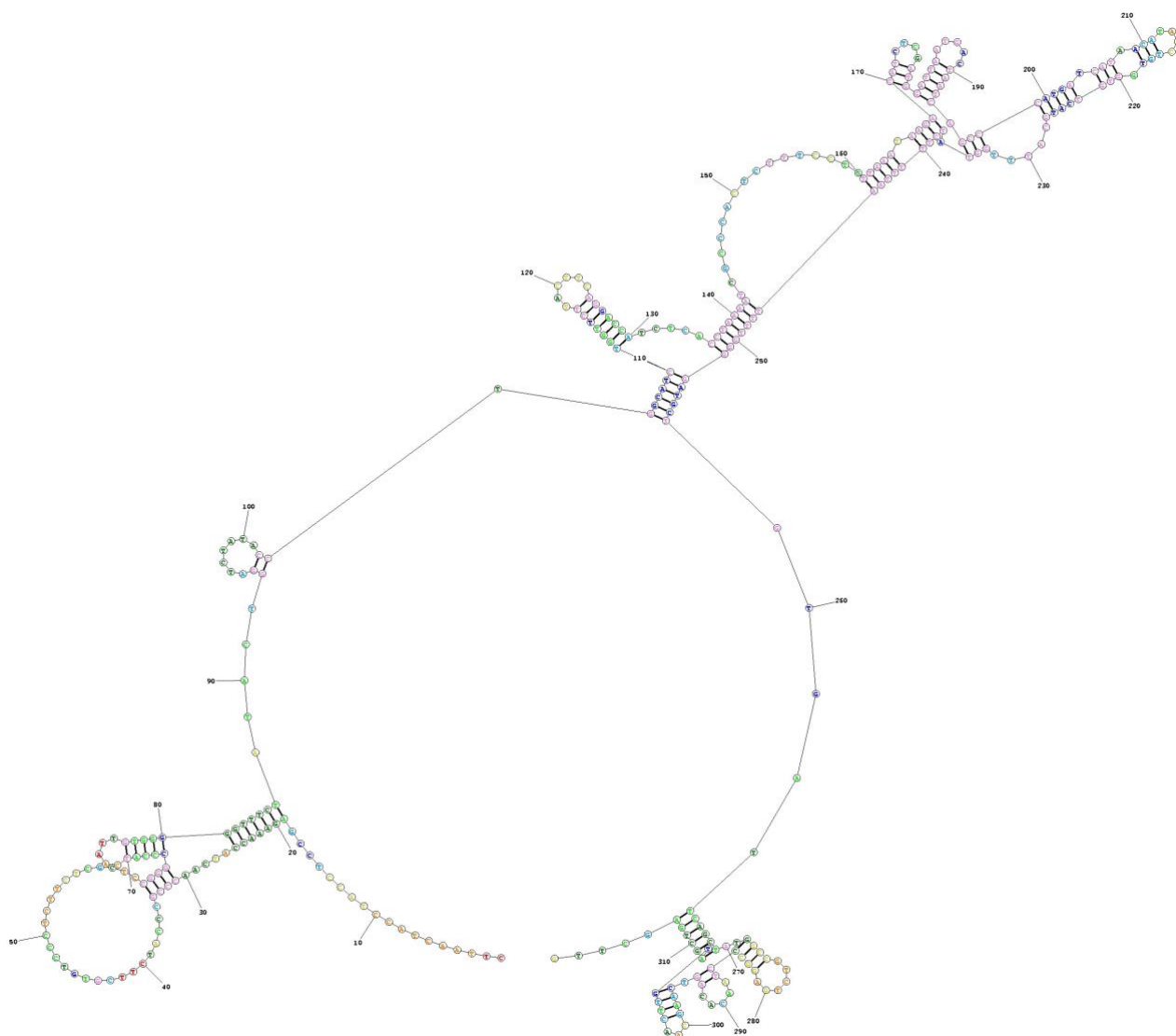


Рис. 3. Энергетически выгодная вторичная структура центрального района D-петли мтДНК малоляховского шерстистого мамонта, рассчитанная с помощью программы «RNAstructure».

Таблица 6. Нуклеотидные последовательности локуса CR у ряда представителей млекопитающих, в том числе хоботных.

Вид (NCBI GenBank Accession No.)	Нуклеотидная последовательность CR, 5' ->3' (начало)
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	СТТААСТАССТАССТССГАААСССАТСААСССГСССАТСТТСТГТСТССТСТТСТСГСТСССГССССАТ
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)
<i>Mammut americanum</i> (EF632344)	...G.....
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)

<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)	...G.....A.G..T.....G.....T.-CGA.TAC.CTT.....
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)	...G.TC...A.G.G.....G.....-..A.TT.....
<i>Procavia capensis</i> (AJ428945)	A...TC...A..TCA..T.....G.....-..AAA.A.....
<i>Procavia capensis</i> (NC_004919)	A...TC...A..TCA..T...T..G.....AA-..A.....
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301)	A.....T.....G.....-..AAA.ACT.....
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	CAATTGTGGGGTTCCTATACTGGATCTATACCTGGCATCTGGTTCTTACTTCAGGACCATCTCACCTAA
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)T.....
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)
<i>Mammuth americanum</i> (EF632344)T.....
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)T.....
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)T.....
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)T.....T.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)T.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)T.....
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)	A.C.....G...C...A.....T.....G.....
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)	A.C.....G...A...A.....T.....G.....
<i>Procavia capensis</i> (AJ428945)	A.CA.....AG...G...A.....
<i>Procavia capensis</i> (NC_004919)	A.CAC.....AG...A...A.....T...A.....
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301)	A.CA.....AG...AC...A.....T...A.....
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	AATCGCCCACTCTTTCCTCTTAAATAAGACATCTCGATGGATTAATGACTAATCAGCCCATGATCATAAC
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)T.....
<i>Mammuth americanum</i> (EF632344)T.....
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)T.....
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)T.....
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)T.....
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)Y.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)T.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)T.....
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)	.T.....C.....C.T.....
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)	.T.....C.T.....
<i>Procavia capensis</i> (AJ428945)A.....C.....C.....
<i>Procavia capensis</i> (NC_004919)A...C.....C.....C.....

<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301) A C C
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	ATAACTGTGGTGTGCATTCATTGGTATCTTTTAAATTTGGGGATGCTGTGATTACAGCTATGGCCGCTCG
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)
<i>Mammut americanum</i> (EF632344)
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)--.....
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)C..T.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)C..T.....
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)A.....-.....C.....AAC..C...A...-.....
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)-.....ACC..C...A...-.....
<i>Procavia capensis</i> (AJ428945)T.....-.....C..A...-.....
<i>Procavia capensis</i> (NC_004919)A.....-.....C..A...-.....
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301)T.....-.....G.....C..A...-.....
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	AGGCCCTAA-CACAGTCAAGCAACTTGTAGCTGAGCTTG
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)-.....
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)-.....
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)-.....
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)-.....
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)-.....
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)-.....
<i>Mammut americanum</i> (EF632344)-.....
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)T.....-.....
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)T.....-.....
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)-.....
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)-.....
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)-.....
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)-.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)-.....
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)-.....
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)T.....-.....G...AT.....A.CCA
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)-.....A.....A.CCT
<i>Procavia capensis</i> (AJ428945)-TGGGGTT.....AT.....CCT
<i>Procavia capensis</i> (NC_004919)TGGGGTT.....AT.....CCT
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301) TGGGGTT AT CCT

Локусы CSB1, CSB2, CSB3, также как и ETAS, высоко консервативны у ныне живущих и вымерших представителей отряда хоботных (табл. 7), что не удивительно, учитывая важную функциональную роль этих участков ДНК в инициации процесса транскрипции мтДНК. Из табл. 7 видно, что из трех локусов CSB1-3 наиболее консервативным является локус CSB3,

нуклеотидная последовательность которого практически не менялась в процессе эволюции хоботных.

Ввиду исключительной функциональной важности локусов CSB1, CSB2 и CSB3 для транскрипции мтДНК, их отсутствие в митохондриальном геноме лесного слона (*Loxodonta cyclotis*) может указывать на неполный сиквенс контрольного района лесного слона (KJ557423 [18] и NC_020759 [19]). Проверить это можно было бы в случае успешной амплификации этих локусов с помощью локус-специфичных праймеров, что не входило в задачи нашего исследования.

Таблица 7. Нуклеотидные последовательности консервативных районов локусов CSB1, CSB2, CSB3 у ряда представителей млекопитающих, в том числе хоботных.

Вид (NCBI GenBank Accession No.)	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'		
	CSB1	CSB2	CSB3
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	ATTCAGTCAATGCTCAGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)	ATTCAGTCAATGCTCAGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Mammuthus americanus</i> (EF632344)	ATTCAGTCAATGCTTGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGAGATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)	ATTCAGTCAATGCTCGGAGGACATA	CAAACCCCCCT-TACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)	S/A	S/A	S/A
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)	S/A	S/A	S/A
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)	ATTCAGTCAATGCTC-GAGGACATA	CAAACCCCCCT-ACCCCCCT	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)	ATTCAGTCAATGCTC-GAGGACATA	CAAACCCCCCT-ACCCCCCT	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Procapra capensis</i> (AJ428945)	ATTCAGTCAATGCTTGAAGGACATA	CAAACCCCCCTTACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Procapra capensis</i> (NC_004919)	ATTCAGTCAATGCTTGAAGGACATA	CAAACCCCCCTTACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301)	ATTAAATTAATGCTCGAAAGACATA	TAAACCCCCC-CACCCCCC	TGTCAAACCCCAAAAGCA

Примечание. Серым цветом выделены полиморфные участки и сайты нуклеотидных последовательностей CSB1, CSB2 и CSB3 контрольного района мтДНК малоляховского мамонта. «S/A» (the sequence is absent) – обозначает отсутствие CSB1, CSB2 или CSB3 в полной последовательности мтДНК представителя вида.

Между CSB1 и CSB2 участками контрольного района мтДНК малоляховского мамонта расположен VNTR-локус, состоящий из повторяющегося четыре раза мотива

ACGTACACGTACGTACACGCACGTACACGTAC (за исключением двух транзиций C↔T и двух инделов внутри мотивов). Учитывая, что первичная нуклеотидная последовательность VNTR-локуса склонна к образованию множества энергетически выгодных вторичных одноцепочечных структур (рис. 4), можно предположить его некую роль в процессах репликации либо транскрипции мтДНК шерстистого мамонта. С другой стороны, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей контрольного района других шерстистых мамонтов (NC_007596 [1], AP008987 и DQ316067 [3]) показал, что эти участки полиморфны, что плохо согласуется с гипотезой о важной роли VNTR-локуса в функционировании митохондриального генома, предполагающей низкую изменчивости таких локусов, особенно внутри вида или между близкими видами.

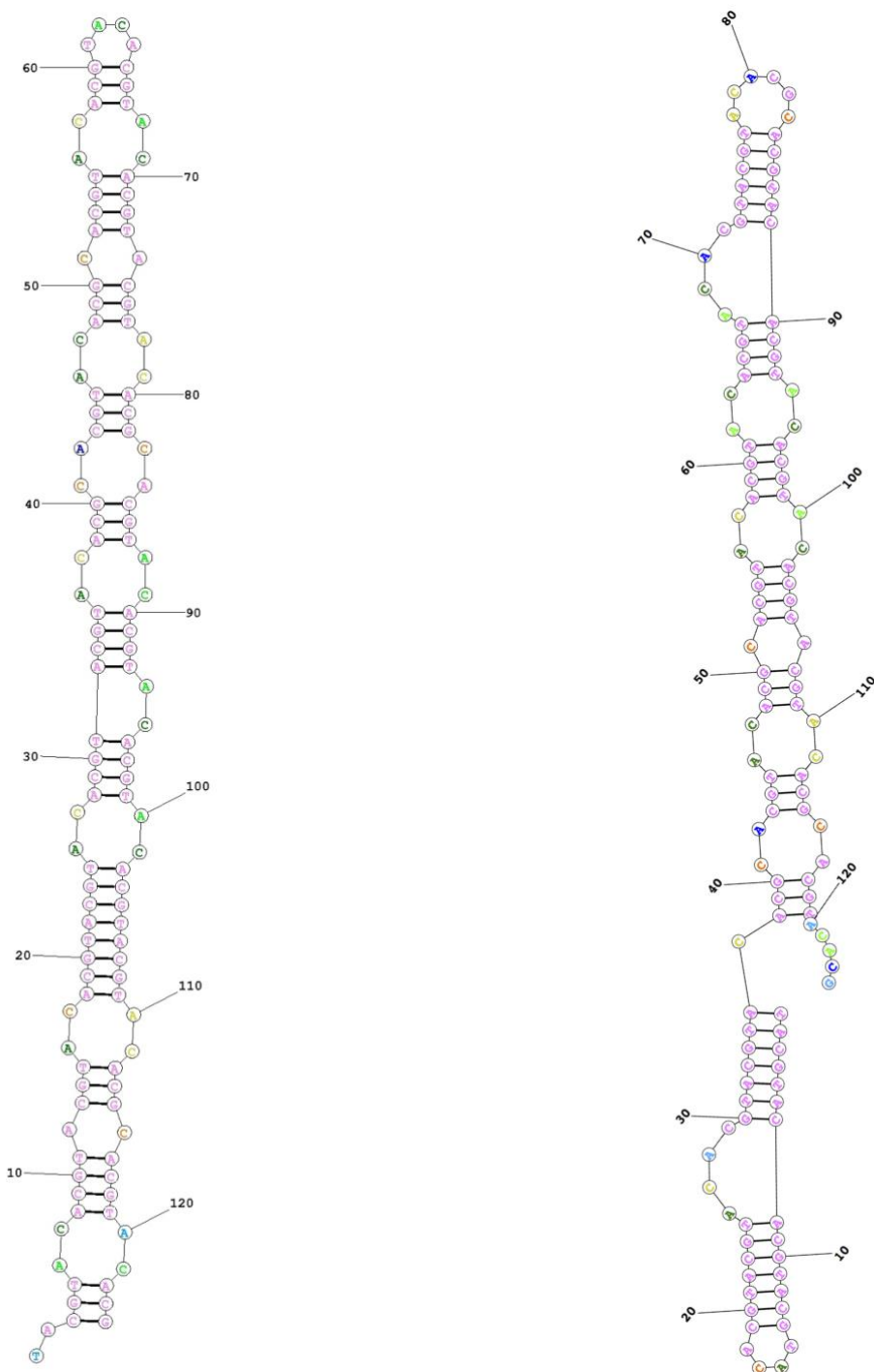


Рис. 4. Две наиболее энергетически выгодные вторичные структуры одноцепочечного VNTR-локуса контрольного района мтДНК малоляховского мамонта, рассчитанные с помощью программы «RNAstructure».

Кроме VNTR-локуса между CSB1 и CSB2 контрольного района мтДНК малоляховского шерстистого мамонта локализован протяженный участок STR с повторяющимся мотивом ACGCAT. Количество повторов в этом STR локусе составляет не менее 40. Более точную цифру определить крайне затруднительно в виду ошибок *Taq*-полимеразы в процессе ПЦР

(рис. 5.). Такого рода ошибки, вероятно, возникают в процессе репликации протяженных участков, содержащих простые повторы, как например (ACGCAT)_n, вследствие образования ими многочисленных пространственных шпильчатых структур, одна из которых (ACGCAT)_{≥40} приведена на рис. 6.

А

Б

Рис. 5. Результаты секвенирования участка контрольного района мтДНК малоляховского мамонта, содержащего STR (ACGCAT)_{≥40}. А – секвенирование с использованием прямого праймера F16146. Б – секвенирование с использованием обратного праймера R16611.

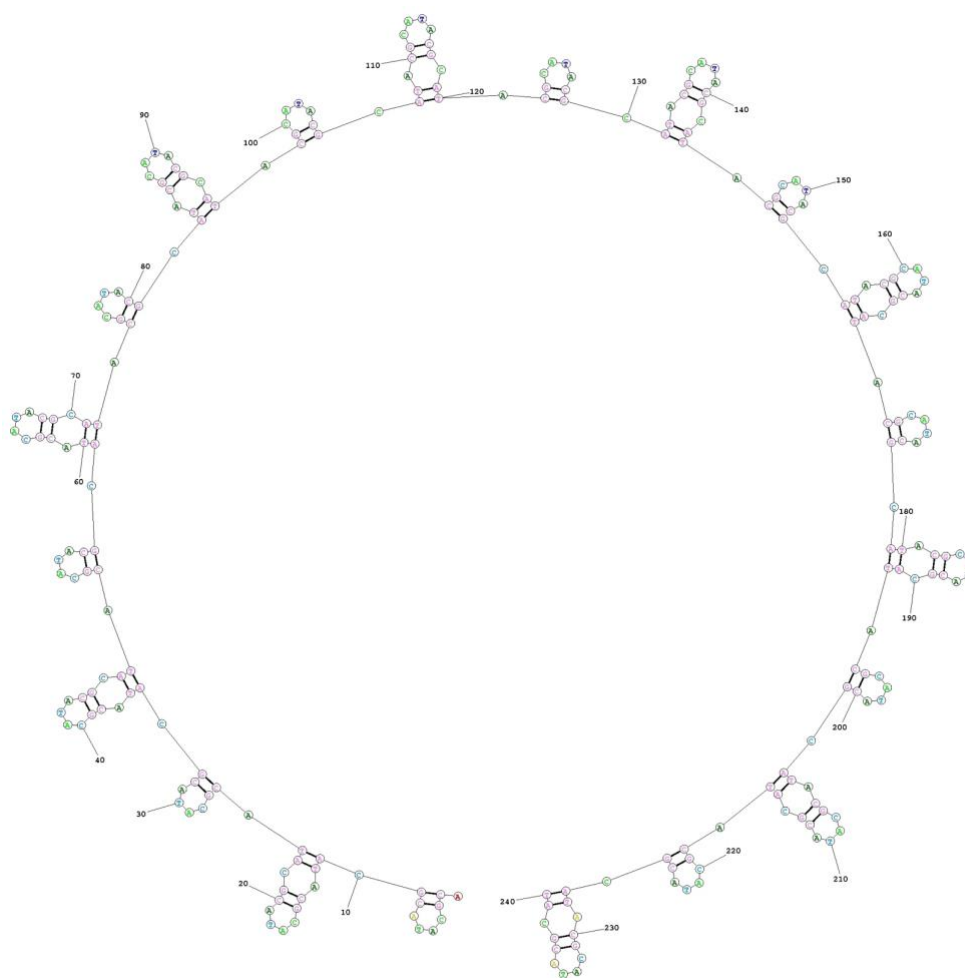


Рис. 6. Наиболее энергетически выгодная вторичная структура STR локуса (ACGCAT)₄₀ контрольного района мтДНК малоляховского мамонта, рассчитанная с помощью программы «RNAstructure».

Возникновение ошибок, связанных с пропуском или вставкой повтора ACGCAT в процессе репликации этого STR-локуса может приводить к гетероплазии по длине мтДНК в результате ошибок репликации. Действительно, при проведении ПЦР амплификации данного участка, были одновременно получены десятки ампликонов различной длины с шагом 6 нуклеотидных пар (рис. 7). Маловероятно, что наблюдаемая гетероплазия ложная и является артефактом, возникающем из-за ошибок *Taq*-полимеразы в процессе проведения ПЦР, иногда происходящих при амплификации участков с высокоповторяющимися мотивами. Обычно такие ошибки связаны с гораздо более короткими мотивами, такими как моно- и динуклеотидные повторы. Полиморфизм длины ПЦР-продуктов в пределах одной пробы может зависеть также от того, насколько удачно подобраны праймеры для исследуемого участка мтДНК. Однако мы наблюдали в процессе ПЦР амплификации гетероплазию независимо от того, с помощью каких праймеров были получены ампликоны.

Стоит отметить, что гетероплазмия длины контрольного района мтДНК, обусловленная наличием различного количества tandemных повторов, имеет место в различных таксономических группах эукариот, начиная от дрожжей [20] и заканчивая высшими млекопитающими [21, 22], включая африканских слонов [23].

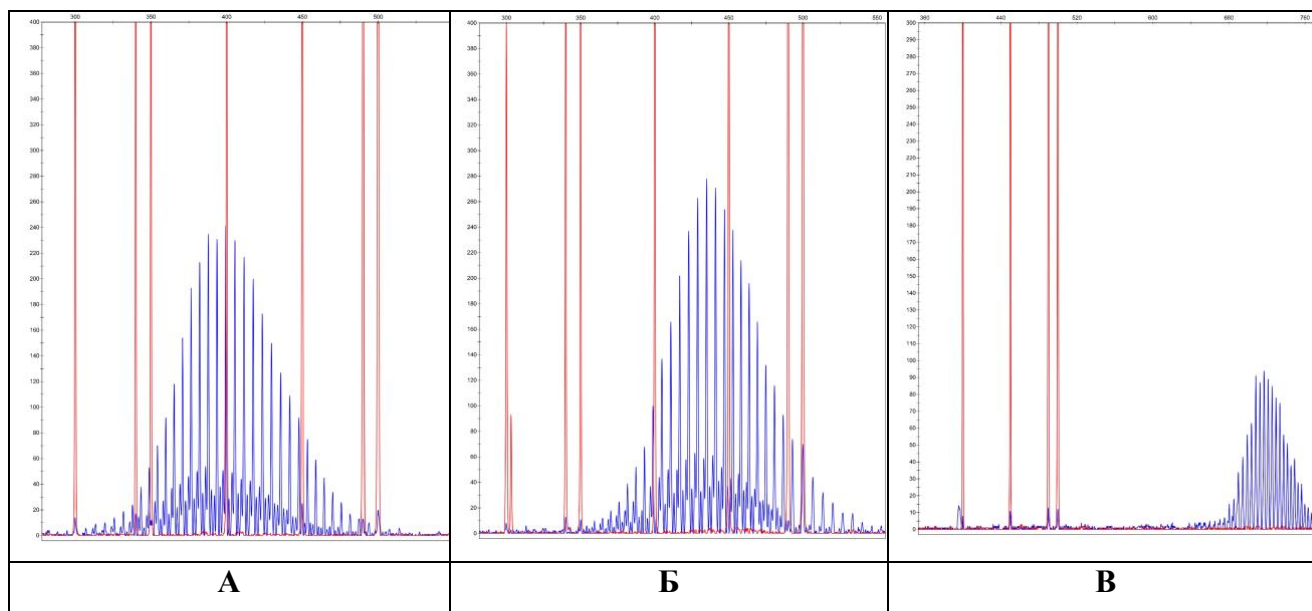


Рис. 7. Гетероплазмия по длине, возникающая в процессе проведения ПЦР амплификации участка контрольного района малоляховского мамонта, содержащего STR-повторы (ACGCAT)_{>40}. Разница в размерах между ампликонами кратна 6 нуклеотидам. А – Пара праймеров F16146/R16570 (ожидаемый размер ампликона 425 н.п.). Б - Пара праймеров F16146/R16611 (ожидаемый размер ампликона 466 н.п.). В - Пара праймеров F16146/R60 (ожидаемый размер ампликона 766 н.п.).

Несмотря на то, что число STR-повторов у хоботных и родственных видов является изменчивым признаком (табл. 8), нуклеотиды «основного» („core“) мотива ACGCAT проявляют высокую степень консервативности в процессе эволюции. Так, первичная последовательность «основного» мотива STR-локуса контрольного района мтДНК малоляховского мамонта (ACGCAT) идентична нуклеотидным последовательностям мотива этого локусов у других хоботных: шерстистых мамонтов (NC_007596 [1], AP008987, DQ316067 [3]), азиатских (AJ428946 [24], EF588275, NC_005129 [3]) и африканских слонов (NC_000934 [23], DQ316069 [3]). Наличие STR (ACGCAT)_n в контрольном регионе мтДНК характерно не только для хоботных, но и для их биологически родственных видов, таких как дюгонь (NC_003314 [25]), американский ламантин (NC_010302 [24]) и западный даман (*Dendrohyrax dorsalis*, NC_010301 [24]). Стоит отметить, что в контрольном регионе мтДНК капского дамана (*Procavia capensis*, AJ428945 [24] и NC_004919 [26]) вместо tandemных

повторов (ACGCAT)_n присутствуют тандемные повторы с «основным» мотивом GTATACAC. Эти факты указывают на приблизительное время возникновения STR (ACGCAT)_n в контрольном регионе мтДНК млекопитающих – не позднее эоцена.

Таблица 8. Количество повторов ACGCAT в STR-локусе контрольного района мтДНК у ряда представителей млекопитающих, в том числе хоботных.

Вид (NCBI GenBank Accession No.)	Количество повторов ACGCAT
Малоляховский <i>M. primigenius</i>	> 40
<i>Mammuthus primigenius</i> (JF912200)	N
<i>Mammuthus primigenius</i> (EU153458)	N
<i>Mammuthus primigenius</i> (NC_007596)	28
<i>Mammuthus primigenius</i> (AP008987)	49
<i>Mammuthus primigenius</i> (DQ316067)	50
<i>Mammuthus columbi</i> (JF912199)	N
<i>Mammut americanum</i> (EF632344)	N
<i>Elephas maximus</i> (EF588275)	31
<i>Elephas maximus</i> (NC_005129)	39
<i>Elephas maximus</i> (AJ428946)	30
<i>Loxodonta africana</i> (NC_000934)	43
<i>Loxodonta africana</i> (AB443879)	N
<i>Loxodonta africana</i> (DQ316069)	38
<i>Loxodonta cyclotis</i> (NC_020759)	N
<i>Loxodonta cyclotis</i> (KJ557423)	N
<i>Dugong dugon</i> (NC_003314)	65
<i>Trichechus manatus</i> (NC_010302)	72
<i>Dendrohyrax dorsalis</i> (NC_010301)	37

Примечание. «N» - определить количество повторов ACGCAT не представляется возможным ввиду отсутствия полного сиквенса контрольного района мтДНК.

Таким образом, в настоящей работе впервые расшифрованы все функционально значимые участки контрольного района мтДНК шерстистого мамонта, а также показана возможная функциональная роль повторяющихся нуклеотидных мотивов, локализованных между консервативными локусами CSB1 и CSB2, отвечающих за терминацию транскрипции митохондриального генома.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Krause J., Dear P.H., Pollack J.L., Slatkin M., Spriggs H., Barnes I., Lister A.M., Ebersberger I., Pääbo S., Hofreiter M. 2006. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature*. **439**, 724-727.
2. Poinar H.N., Schwarz C., Qi J., Shapiro B., Macphee R.D., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A., Rampp M., Miller W., Schuster S.C. 2006. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science*. **311**, 392-394.
3. Rogaev E.I., Moliaka Y.K., Malyarchuk B.A., Kondrashov F.A., Derenko M.V., Chumakov I., Grigorenko A.P. Complete mitochondrial genome and phylogeny of Pleistocene Mammoth *Mammuthus primigenius*. PLoS Biol. 2006. 4, e73.4a) Gilbert M.T., Drautz D.I., Lesk A.M., Ho S.Y., Qi J., Ratan A., Hsu C.H., Sher A., Dalén L., Götherström A., Tomsho L.P., Rendulic S., Packard M., Campos P.F., Kuznetsova T.V., Shidlovskiy F., Tikhonov A., Willerslev E., Iacumin P., Buigues B., Ericson P.G., Germonpré M., Kosintsev P., Nikolaev V., Nowak-Kemp M., Knight J.R., Irzyk G.P., Perbost C.S., Fredrikson K.M., Harkins T.T., Sheridan S., Miller W., Schuster S.C. 2008. Intraspecific phylogenetic analysis of Siberian woolly mammoths using complete mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 8327-8332.
4. Enk J., Devault A., Debruyne R., King C.E., Treangen T., O'Rourke D., Salzberg S.L., Fisher D., MacPhee R., Poinar H. 2011. Complete Columbian mammoth mitogenome suggests interbreeding with woolly mammoths. *Genome Biol.* **12**, R51.
5. Chang D., Knapp M., Enk J., Lippold S., Kircher M., Lister A., MacPhee R.D., Widga C., Czechowski P., Sommer R., Hodges E., Stümpel N., Barnes I., Dalén L., Derevianko A., Germonpré M., Hillebrand-Voiculescu A., Constantin S., Kuznetsova T., Mol D., Rathgeber T., Rosendahl W., Tikhonov A., Willerslev E., Hannon G., Lalueza-Fox C., Joger U., Poinar H., Hofreiter M., Shapiro B. 2017. The evolutionary and phylogeographic history of woolly mammoths: a comprehensive mitogenomic analysis. *Sci Rep.* **27**, 44585.
6. Kornienko I.V., Faleeva T.G., Oreshkova N.V., Grigoriev S.E., Grigoreva L.V., Simonov E.P., Kolesnikova A.I., Putintseva Yu.A., Krutovsky K.V. 2018. Complete mitochondrial genome of a woolly mammoth (*Mammuthus primigenius*) from Maly Lyakhovsky Island (New Siberian Islands, Russia) and its phylogenetic assessment. *Mitochondrial DNA Part B*. **3**, 596-598.
7. Grigoriev S.E., Fisher D.C., Obada T., Shirley E.A., Rountrey A.N., Savvinov G.N., Garmaeva D.K., Novgorodov G.P., Cheprasov M.Y., Vasilev S.E. 2017. A woolly mammoth

- (*Mammuthus primigenius*) carcass from Maly Lyakhovsky Island (New Siberian Islands, Russian Federation). *Quaternary International*. **445**, 89-103.
8. PrepFiler User Guide. Applied Biosystems, 2008. 84 p.
 9. Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ) Protocol. Madison. Promega Corporation, 2006. Rev. 5. 11 p.
 10. DNA IQ System - Small Sample Casework Protocol. Technical Bulletin. Madison. Promega Corporation, 2006. Rev. 4. 14 p.
 11. Корниенко И.В., Харламов С.Г. 2012. Методы исследования ДНК человека. Выделение ДНК и ее количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения: Учебно-методическое пособие. Ростов-на-Дону: ЮФУ, 216 с.
 12. Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 6196-6200.
 13. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **23**, 2947–2948.
 14. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. 2012. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. **28**, 1166–1167.
 15. Sbisà E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G., Saccone C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*. **205**, 125-140.
 16. Reuter J.S., Mathews D.H. 2010. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*. **11**, 129-137.
 17. Корниенко И.В., Брень А.Б., Войнова Н.В., Гуськов Е.П. 2004. Структурная организация митохондриальной ДНК позвоночных животных. *Успехи современной биологии*. Т. **124**. № 1. С. 17-27.
 18. Finch T.M., Zhao N., Korkin D., Frederick K.H., Eggert L.S. 2014. Evidence of positive selection in mitochondrial complexes I and V of the African elephant. *PLoS ONE*. **9**, e92587.
 19. Brandt A.L., Ishida Y., Georgiadis N.J., Roca A.L. 2012. Forest elephant mitochondrial genomes reveal that elephantid diversification in Africa tracked climate transitions. *Mol. Ecol.* **21**, 1175-1189.
 20. Skelly P.J., Clark-Walker G.D. 1991. Polymorphisms in tandemly repeated sequences of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA. *J Mol Evo.* **32**, 396-404.

21. Dufresne C., Mignotte F., Gueride M. 1996. The presence of tandem repeats and the initiation of replication in rabbit mitochondrial DNA. *European Journal of Biochemistry*. **235**, 593-600.
22. Lunt D.H., Whipple L.E., Hyman B.C. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol. Ecology*. **7**, 1441-1455.
23. Hauf J., Waddell P.J., Chalwatzis N., Joger U., Zimmermann F.K. 2000. The complete mitochondrial genome sequence of the African elephant (*Loxodonta africana*), phylogenetic relationships of Proboscidea to other mammals and D-loop heteroplasmy. *Zoology*. **102**, 184-195.
24. Arnason U., Adegoke J.A., Gullberg A., Harley E.H., Janke A., Kullberg, M. 2008. Mitogenomic relationships of placental mammals and molecular estimates of their divergences. *Gene*. **421**, 37-51.
25. Arnason U., Adegoke, J.A., Bodin K., Born E.W., Esa Y.B., Gullberg A., Nilsson M., Short R.V., Xu X., Janke A. 2002. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8151-8156.
26. Murata Y., Nikaido M., Sasaki T., Cao Y., Fukumoto Y., Hasegawa M., Okada N. 2003. Afrotherian phylogeny as inferred from complete mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evo.* **28**, 253-260.